

**Dipeptides, preparation process and use in dosing proteases.**

Patent Number: EP0280610  
Publication date: 1988-08-31  
Inventor(s): QUENTIN GERARD  
Applicant(s): SERBIO (FR)  
Requested Patent: ☐ EP0280610, B1  
Application Number: EP19880400304 19880210  
Priority Number(s): FR19870002259 19870220  
IPC Classification: C07K5/06; C12Q1/36  
EC Classification: C07K5/06A1, C07K5/06A2, C07K5/06H2A, C12Q1/37  
Equivalents: DE3875359D, DE3875359T, ☐ FR2611205  
Cited Documents: GB2130221; FR2471411; CH616912; EP0085255; EP0074787; EP0000330; DD107947

---

**Abstract**

As new industrial products, the dipeptides of formula: Q-A1-A2-R1 (I> where Q is an RO-CO-(CR<sub>2</sub>R<sub>3</sub>)<sub>n</sub>-CO residue (where R is H, C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> alkyl, optionally substituted phenyl, optionally substituted benzyl or p-CH<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>SO<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>, each of R<sub>2</sub> and R<sub>3</sub>, which are identical or different, denotes H or C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> alkyl and n is an integer with a value of 1 to 5), A<sub>1</sub> is a nonbasic amino acid residue, A<sub>2</sub> is a basic alpha -amino acid residue, and R<sub>1</sub> is an NHR'<sub>1</sub> amino residue constituting a marker which can be cleaved from A<sub>2</sub> by enzyme hydrolysis (where R'<sub>1</sub> is a support for the means of marking); and their addition salts. These new products can be used as enzyme substrates especially in the field of biological assays.

---

Data supplied from the esp@cenet database - I2



⑫

**DEMANDE DE BREVET EUROPEEN**

⑲ Numéro de dépôt: **88400304.7**

⑧ Int. Cl.4: **C 07 K 5/06**  
**C 12 Q 1/36**

⑳ Date de dépôt: **10.02.88**

③① Priorité: **20.02.87 FR 8702259**

④③ Date de publication de la demande:  
**31.08.88 Bulletin 88/35**

④④ Etats contractants désignés: **DE**

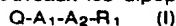
⑦① Demandeur: **SERBIO**  
**30, Avenue Flachat**  
**F-92600 Asnières (FR)**

⑦② Inventeur: **Quentin, Gérard**  
**145, rue des Renouillers**  
**F-92700 Colombes (FR)**

⑦④ Mandataire: **Cliscl, Serge et al**  
**S.A. FEDIT-LORiot 38 avenue Hoche**  
**F-75008 Paris (FR)**

④⑤ **Dipeptides, procédé de préparation et utilisation dans le dosage de protéases.**

④⑦ La présente invention vise en tant que produits industriels nouveaux les dipeptides de formule :



où Q est un reste  $RO-CO-(CR_2R_3)_n-CO$  (où R est H, alkyle en C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>, phényle éventuellement substitué, benzyle éventuellement substitué ou  $p-CH_3C_6H_4SO_2CH_2$ , R<sub>2</sub> et R<sub>3</sub> identiques ou différents représentent chacun H ou alkyle en C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>, et n est un nombre entier valant 1 à 5), A<sub>1</sub> est un reste d'acide aminé non basique, A<sub>2</sub> est un reste d'acide aminé basique, et R<sub>1</sub> est un reste amino NHR'<sub>1</sub> constituant un marqueur clivable de A<sub>2</sub> par hydrolyse enzymatique (où R'<sub>1</sub> est un support du moyen de marquage); et leurs sels d'addition.

Ces nouveaux produits sont utiles comme substrats enzymatiques notamment dans le domaine des dosages biologiques.

**EP 0 280 610 A1**

## Description

Dipeptides, procédé de préparation et utilisation dans le dosage de protéases

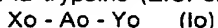
## DOMAINE DE L'INVENTION

La présente invention concerne, en tant que produits industriels nouveaux, les composés dipeptides de formule I ci-après. Elle concerne également leur procédé de préparation et leur utilisation dans le domaine du dosage de protéases et de peptidases, en particulier en tant que substrats dans le domaine du dosage quantitatif d'enzymes de la classe E.C. 3.4.4 (à présent nouvelle classe "E.C. 3.4.21", selon l'ouvrage "Enzyme Nomenclature", Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam 1973, page 238 et suivantes).

## ART ANTERIEUR

On sait que les enzymes de la classe sus-visée sont des substances qui scindent les liaisons amides du squelette protéique ou peptidique du côté du groupe carboxyle des restes Arg, Lys, Orn et His. Il s'agit là d'un mécanisme de clivage bien connu de l'homme du métier et qui est amplement exemplifié dans les documents antérieurs cités ci-après.

On sait que l'on a déjà proposé dans le passé des substrats spécifiques pour le dosage d'enzymes de ladite classe tels que notamment la thrombine (E.C. 3.4.21.5), la plasmine (E.C. 3.4.21.7), le Facteur Xa (E.C. 3.4.21.6) et la trypsine (E.C. 3.4.31.4), lesdits substrats étant des substances de formule brute :



dans laquelle Xo représente un groupe protecteur et le cas échéant un atome d'hydrogène; Yo est un groupe de marquage, notamment un reste radioactif ou un reste capable de conférer, avant ou (mieux) après clivage, une coloration ou une fluorescence; et, Ao est un reste de monoaminoacide ou de polyaminoacide et de préférence un reste tri- ou tétrapeptidique.

Le groupe protecteur Xo est fixé sur l'extrémité N-terminale de la chaîne Ao et représente de façon classique dans la littérature antérieure un groupe acétyle, benzoyle, t-butyloxycarbonyle, benzyloxycarbonyl, succinyle, tosylé ou analogue.

Historiquement, les premiers substrats qui ont été proposés sont ceux dans lesquels Ao représentait un reste de monoaminoacide. Voir à cet effet, l'article de ERLANGER et al., Arch. Biochem. Biophys., 95, 271 (1961) qui décrit les premiers substrats du type



Les dérivés de formule Io où Ao est un reste de monoaminoacide ne se sont pas révélés particulièrement intéressants en tant que substrats d'enzymes, essentiellement par défaut de sélectivité. Néanmoins, on sait que l'acide  $\gamma$ -glutamyl-p-nitroanilide-3-carboxylique a été proposé dans FR-A- 2 208 886 comme substrat chromogène de la  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase (E.C. 2.3.2.2), et que, dans FR-A-2 546 163 ont été proposés (i) les PHA-L-Phe-Yo et PHA-L-Tyr-Yo (où PHA désigne un reste polyhydroxyalkyle) pour le dosage de la chymotrypsine (E.C. 3.4.31.1), et (ii) les PHA-L-Arg-Yo et PHA-L-Lys-Yo pour le dosage de la trypsine (E.C.3.4.31.4).

Pour pallier les difficultés des substrats monoaminoacides, on sait que l'on a proposé des composés de formule Io, où Ao représente plus particulièrement un reste tri-ou tétrapeptidique et Yo un groupe chromogène scindable ou clivable par hydrolyse enzymatique, pour le dosage des enzymes de la classe susvisée. Le nombre de publications concernant les substrats tétrapeptidiques et surtout tripeptidiques est considérablement supérieur à celui relatif aux substrats de monoaminoacide. Pour information, des tripeptides et des tétrapeptides sont décrits dans les documents FR-A-2 546 163 précité, FR-A- 2 372 798, EP-A-0 004 256, US-A- 4 508 644, US-A- 4 448 715, FR-A- 2 471 411, FR-A- 2 317 280 et FR-A- 2 459 226.

On sait notamment de l'exposé de BARBIER présenté lors du 10ème Congrès National des Biologistes des Hôpitaux Généraux tenu à Hyères les 7-9 octobre 1981, que les composés tétrapeptidiques et surtout tripeptidiques de formule Io étaient les plus intéressants eu égard à leur spécificité vis-à-vis d'enzymes protéolytiques.

En particulier ont été commercialisés avec succès les tripeptides suivants :

H-D-But-L-CHA-L-Arg-pNA, 2AcOH (cf. exemple 41 de US-A- 4 428 874) en tant que substrat de la plasmine, H-D-CHG-L-BUT-L-Arg-pNA, 2AcOH (cf. exemple 71 de US-A- 4 428 874) en tant que substrat de la thrombine, et

CH<sub>3</sub>SO<sub>2</sub>-D-Leu-Gly-L-Arg-pNA, AcOH (selon notamment US-A-4 440 678) en tant que substrat du facteur Xa.

On sait également que des tri- et tétrapeptides chromogènes présentant sur l'extrémité N-terminale de la chaîne peptidique un groupe  $\omega$ -méthoxycarbonylalkylénecarbonyle ou  $\omega$ -éthoxycarbonylalkylénecarbonyle (où le fragment alkylénecarbonyle comporte 2 à 4 atomes de carbone) ont été proposés dans EP-A-0 128 118 qui décrit spécifiquement les EtO -CO-CH<sub>2</sub>-CO-Lys ( $\epsilon$ -Cbo)-Gly-Arg-pNA, AcOH (cf. exemple 14) et MeO-CO-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-CO-Lys ( $\epsilon$ -Cbo)-Gly-Arg-pNA, AcOH (cf. exemple 19). Or il se trouve que, dans la série des tri- et tétrapeptides, le remplacement d'un atome d'hydrogène de l'extrémité N-terminale NH<sub>2</sub> par un groupe oxycarbonylalkylénecarbonyle entraîne une diminution systématique de l'activité (voir à cet effet les résultats d'essais comparatifs consignés dans le tableau III ci-après).

On sait par ailleurs qu'il existe un très grand nombre de publications ayant trait à l'obtention de composés

dipeptidiques. Pratiquement toutes ces publications présentent les composés dipeptidiques, qu'elles décrivent, en tant qu'intermédiaires de synthèse des tri- et tétrapeptides susvisés.

Ponctuellement, le nombre de documents mentionnant l'utilisation de dipeptides comme substrats est très faible, à savoir :

(i) US-A- 4 217 269 qui décrit des phénoxyacétildipeptides chromogènes, en tant que substrats de la thrombine et de la trypsine, notamment les  $\text{PhO-CH}_2\text{CO-L-Pro-L-Arg-pNA}$ ,  $\text{PhO-CH}_2\text{CO-L-Pip-L-Arg-pNA}$ ,  $\text{PhO-CH}_2\text{CO-L-Aze-L-Lys-pNA}$ , et  $\text{PhO-CH}_2\text{CO-L-Pro-L-Orn-pNA}$ ;

(ii) FR-A- 2 471 411 qui propose en tant que substrats, pour le dosage de l'antithrombine III, les dipeptides de formule :

$\text{Xo-L-Pro-L-Arg-pNA}$

où Xo est un groupe  $\alpha$ -hydroxyacyle choisi parmi les L- et D- $\alpha$ -hydroxy- $\beta$ -phénylpropionyle, L- et D- $\alpha$ -hydroxyisocaproyle, et, glucoyle;

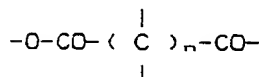
(iii) US-A- 4 448 715 précité qui décrit spécifiquement des tripeptides en tant que substrats de la kallikréine plasmatique et englobe dans sa formule générale des dipeptides de structure :

$\text{Xo-L-Phe-L-Arg-Yo}$

(où Yo est défini comme ci-dessus et Xo représente un groupe cycloalkylcarbonyle dans lequel le reste cycloalkyle comprend de 3 à 6 atomes de carbone) qui ne sont pas exemplifiés; de même des dipeptides sont inclus dans les formules générales proposées par FR-A- 2 546 163 précité et DE-A- 3 108 322, mais ne sont pas spécifiquement exemplifiés dans ces documents.

## OBJET DE L'INVENTION

Suivant l'invention on préconise de nouveaux composés dipeptidiques de formule I ci-après qui (i) diffèrent des dipeptides antérieurement connus comme intermédiaires de synthèse ou substrats par la nature du groupe protecteur Q de l'extrémité N-terminale, qui comporte 2 groupes carbonyle et plus précisément une structure linéaire  $\omega$ -oxycarbonylalkylénecarbonyle :



et (ii) sont utiles en tant que substrats vis-à-vis des enzymes de la classe E.C.3.4.21 susvisée et de l'ancienne classe E.C.3.4.4.

On vient de trouver de façon surprenante que ledit groupe protecteur Q, qui a pour formule  $\text{RO-CO-(CR}_2\text{R}_3)_n\text{-CO}$  (où R, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub> et n sont définis comme indiqué ci-après) et qui est partiellement exemplifié dans EP-A-0 128 118 précité, ne provoque pas dans la série des dipeptides suivant l'invention la baisse d'activité observée pour les séries des tri- et tétrapeptides. Par ailleurs un tel groupe Q n'apparaît pas dans les dipeptides intermédiaires décrits dans EP-A-0 128 118.

Les composés dipeptidiques suivant l'invention sont notamment intéressants en tant que substrats pour le dosage quantitatif de la thrombine, de la plasmine et du Facteur Xa. On a également trouvé qu'ils sont en outre particulièrement intéressants eu égard à leur spécificité vis-à-vis de la Protéine C.

Les nouveaux dérivés dipeptidiques suivant l'invention sont caractérisés en ce qu'ils sont choisis parmi l'ensemble comprenant :

(I) les composés de formule :

$\text{Q-A}_1\text{-A}_2\text{-R}_1$  (I)

dans laquelle :

Q est une reste  $\text{RO-CO-(CR}_2\text{R}_3)_n\text{-CO}$  où

R représente l'atome d'hydrogène, un groupe alkyle en C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>, un groupe phényle éventuellement substitué par un ou plusieurs groupes notamment CH<sub>3</sub>, OCH<sub>3</sub> et alkylénedioxy, un groupe benzyle éventuellement substitué par un ou plusieurs groupes, notamment CH<sub>3</sub>, OCH<sub>3</sub> et alkylénedioxy, ou, un groupe tosylméthyloxy;

R<sub>2</sub> et R<sub>3</sub>, identiques ou différents, représentent chacun l'atome d'hydrogène ou un groupe alkyle en C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>;

n est un nombre entier ayant pour valeur 1 à 5;

R<sub>1</sub> qui est un reste amino de formule  $\text{NH-R}'_1$  constitue un marqueur clivable du groupe A<sub>2</sub> par hydrolyse enzymatique, le groupe R'<sub>1</sub> intervenant comme support du moyen de marquage;

A<sub>1</sub> est un reste de monoaminoacide choisi parmi l'ensemble comprenant les restes d'acides aminés non-basiques;

A<sub>2</sub> est un reste de monoaminoacides choisi parmi l'ensemble comprenant les restes d'acides aminés basiques; et

(ii) leurs sels d'addition.

## ABREVIATIONS

Dans la présente description on a utilisé les abréviations suivantes par commodité :

-pour les restes d'acide aminé :

- Ahx =  $\epsilon$ -aminohexanoyle  
 ACC = 1-amino-cyclohexane-1-carbonyl  
 Aib = 2-aminoisobutyryl (ou 2- méthylalanyle)  
 5 Ala =  $\alpha$ -alanyle  
 $\beta$ -Ala =  $\beta$ -alanyle  
 Arg = arginyle  
 Asn = asparaginyle  
 Asp =  $\alpha$ -aspartyle  
 10  $\beta$ -Asp =  $\beta$ -aspartyle  
 ATC = thiazolidine-4-carbonyl (ou thioprolyl)  
 Aze = azétidine-2-carbonyl  
 But = 2-aminobutyryl (ou  $\alpha$ -amino-n-butyryl)  
 4-But = 4-aminobutyryl (ou  $\gamma$ -amino-n-butyryl)  
 15 CHA = 3-cyclohexylalanyle  
 CHG =  $\alpha$ -cyclohexylglycyl  
 CHT = 3-(4-hydroxycyclohexyl)alanyle  
 Cle = cycloleucyl (ou 1-amino-cyclopropane-1-carbonyl)  
 Cys = cystéyle  
 20 Dab = 2,4-diaminobutyryl  
 $\pi$ -Dab = pyrodiaminobutyryl  
 Gln = glutamyle  
 Glu = glutaminyle  
 $\gamma$ -Glu =  $\gamma$ -glutaminyle  
 25 Gly = glycyl  
 His = histidyle  
 4-Hyp = 4-hydroxyprolyl (ou 4-hydroxy-2-pyrrolidinecarbonyl)  
 3-Hyp = 3-hydroxyprolyl (ou 3-hydroxy-2-pyrrolidinecarbonyl)  
 Ile = isoleucyl  
 30 Leu = leucyl  
 Lys = lysyle  
 Met = méthionyle  
 Nleu = norleucyl  
 NVal = norvalyle  
 35 Orn = ornithinyle  
 Phe = phénylalanyle  
 Phg = phénylglycyl  
 Pip = pipécolinoyle  
 Pro = prolyl  
 40 Pyr = pyroglutaminyle (ou 2-pyrrolidone-5-carbonyl)  
 Sar = sarcosyle  
 Ser = séryle  
 Thr = thréonyle  
 Tyr = tyrosyle  
 45 Val = valyle

- pour les autres abréviations :

- Ac = acétyl  
 AcOH = acide acétique  
 50 Adoc = adamantyloxycarbonyl  
 Aoc = t-amyloxycarbonyl  
 Boc = t-butyloxycarbonyl  
 Bz = benzoyl  
 Bzl = benzyle  
 55 Cbo = carbobenzoxyl  
 CCM = chromatographie sur couche mince  
 o-Cl-pNA = o-chloro-p-nitroanilide  
 DCCI = dicyclohexylcarbodiimide  
 DCHU = dicyclohexylurée  
 60 DMF = diméthylformamide  
 Et = éthyle  
 Et<sub>3</sub>N = triéthylamine  
 Foc = furfuryloxycarbonyl  
 HMPT = N,N,N',N',N'',N''- hexaméthylphosphotriamide  
 65 HOBT = 1-hydroxybenzotriazole

HPLC = chromatographie liquide de haute performance

H-TFA = acide trifluoroacétique

Iboc = isobornyloxycarbonyl

Me = méthyle

MM = CH<sub>3</sub>O-CO-CH<sub>2</sub>-CO- (i.e. méthyloxymalonyl, groupe protecteur suivant l'invention).

nkat = nanokatal (1 nkat est l'activité enzymatique d'un enzyme qui hydrolyse 1 nanomole de son substrat par seconde dans les conditions standard)

OD = densité optique

pNA = p-nitroanilide

Ph = phényle

RT = température ambiante (15-20 °C)

TEA = triéthanolamine

Tos = p-toluènesulfonyl (ou tosyle)

UNIH = unité enzymatique standardisée de l'US National Institute of Health

Z = benzyloxycarbonyl

Z (p-Cl) = p-chlorobenzyloxycarbonyl

Z(p-OMe) = p-méthoxybenzyloxycarbonyl

## DESCRIPTION DETAILLEE DE L'INVENTION

Parmi les groupes alkyle en C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> inclus dans les définitions de R, R<sub>2</sub> et R<sub>3</sub>, qui conviennent selon l'invention, on peut mentionner notamment les groupes CH<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub> et CH(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>.

Parmi les groupes benzyles substitués qui entrent dans la définition de R on peut notamment citer les groupes 3-méthylbenzyle, 3,5-diméthylbenzyle, 4-méthylbenzyle, 4-méthoxybenzyle, 3,4-diméthoxybenzyle, 2,4,6-triméthoxybenzyle et 3,4-méthylènedioxybenzyle.

Parmi les groupes phényle substitués, qui entrent dans la définition de R, on peut notamment mentionner les groupes o-, m- et p-tolyle, xylile, 2-, 3- et 4-méthoxyphényle, 3,5-diméthoxyphényle, 3,4-diméthoxyphényle, 2,4-diméthoxyphényle, 3,4,5-triméthoxyphényle, 2,4,6-triméthoxyphényle, 3,4-méthylènedioxyphényle, 3-méthoxy-4-méthylphényle et 4-méthoxy-3-méthylphényle. De façon avantageuse, on préfère surtout suivant l'invention que R = CH<sub>3</sub> et que R<sub>2</sub> = R<sub>3</sub> = H

A<sub>1</sub> est un reste de monoaminoacide non basique. Il provient d'un aminoacide naturel ou synthétique ayant un pH inférieur ou égal à 7 ou d'un aminoacide ayant un pH supérieur à 7 mais convenablement substitué pour bloquer essentiellement son caractère basique et atteindre un pH inférieur ou égal à 7.

A<sub>1</sub> englobe donc:

1°) les restes d'acides naturels ou synthétiques qui comprennent une seule fonction acide et une seule fonction basique,

2°) les restes d'acides naturels ou synthétiques qui comprennent une seule fonction basique et plus d'une fonction acide et dans lesquels chaque fonction acide latérale (n'entrant pas ou n'intervenant pas dans la liaison peptidique) est susceptible d'être bloqué notamment sous forme amide ou ester, et

3°) les restes d'acides naturels ou synthétiques qui comprennent une seule fonction acide et plus d'une fonction basique et dans lesquels chaque fonction basique latérale est convenablement substituée pour bloquer et supprimer essentiellement son caractère basique.

Bien entendu les restes d'acides sus-visés, qui sont notamment énumérés dans le chapitre abréviation ci-dessus, peuvent comporter des groupes hydroxyle (OH) ou thiol (SH) latéraux qui sont susceptibles d'être bloqués, le cas échéant, par un groupe protecteur éther ou ester.

Conviennent en particulier pour A<sub>1</sub>, les restes provenant d'acides:

- naturels non-basiques dits "neutres" tels que notamment Ala, β-Ala, Cys, Gln, Gly, 4-Hyp, 3-Hyp, Leu, Met, MLeu, NVal, Phe, Pro, Sar, Ser, Thy, Tyr, Val, où le groupe OH latéral des restes 4-Hyp, 3-Hyp, Ser, Thr, Tyr est protégé ou non par un groupe protecteur éther ou ester, et où le groupe SH latéral du reste Cys est protégé ou non par un groupe protecteur thioéther ou thioester;

- naturels acides tels que notamment Asp, β-Asp, Glu, γ-Glu, dans lesquels la fonction acide latérale est libre ou bloquée sous forme ester, notamment sous forme d'ester benzylique ou t-butylque;

- naturels initialement basiques dans lesquels la ou les fonctions basiques latérales n'entrant pas dans la liaison peptidique sont bloquées par un groupe convenable éliminant pratiquement le caractère basique tel que Boc, Cbo etc, lesdits restes d'acide étant notamment les restes Arg, Lys, His, et Orn convenablement bloqués notamment par un groupe Cbo;

- synthétiques non-basiques dits "neutres" tels que notamment ACC, Ahx, Alb, ATC, Aze, But, 4-But, CHA, CHG, CHT (où le groupe OH latéral est protégé le cas échéant sous forme éther ou ester), Cle, π-Dab, Phg, Pip, Pyr;

- synthétiques initialement basiques dans lesquels chaque fonction basique latérale est protégée par un groupe convenable éliminant substantiellement le caractère basique, notamment le reste Dab où la fonction basique latérale est bloquée par un groupe tel que Cbo.

Parmi les restes d'acides synthétiques qui conviennent également, on peut notamment mentionner (I) les restes d'acides cycloaliphatiques où le group amino et le groupe carboxy sont situés sur le même atome de carbone cyclique (tels que Cle susvisé) ou sur deux atomes de carbone cycliques différents et (II)

les restes d'acides aminés aromatiques tels que notamment les restes o-, m- et p-aminobenzoyl, et, les restes d'acides aminés aliphatiques tels que notamment les p-aminobenzylcarbonyl, m-aminobenzylcarbonyl.

De façon avantageuse le reste A<sub>1</sub> selon l'invention sera un reste d'α-aminoacide tel que ACC, Aib, Ala, ATC, Aze, But, CHA, CHG, CHT, Cle, Gly, 4-Hyp, 3-Hyp, Ile, Leu, Met, NLeu, NVal, Phe, Pip, Pro, Sar, Ser, Thr, Tyr, Val, un reste β-Ala, ou un reste CHT, 4-Hyp, 3-Hyp, Ser, Thr, Tyr dans lequel le groupe latéral OH est protégé par un groupe éther ou ester.

Le reste A<sub>1</sub> comprend donc des restes d'acides aminés tel que Aib, Cle, Gly, Sar et 4-But dépourvus d'atome de carbone asymétrique, et des restes d'acides aminés présentant un atome de carbone asymétrique.

Lorsque l'acide aminé présente un atome de carbone asymétrique, le reste A<sub>1</sub> est, de préférence, de configuration L car les dipeptides de formule I dans lesquels A<sub>1</sub> est un reste de configuration D sont en général inactifs ou peu actifs en tant que substrats.

Le groupe A<sub>1</sub>, selon l'invention sera de préférence un groupe Aib, L-Ala, β-Ala, L-ATC, L-Aze, L-But, L-CHA, L-CHG, L-CHT, Cle, Gly, L-4-Hyp, L-3-Hyp, L-Ile, L-Leu, L-NLeu, L-NVal, L-Phe, L-Pip, L-Pro, Sar, L-Ser, L-Thr, L-Tyr, L-Val ou un reste L-CHT, L-4-Hyp, L-3-Hyp, L-Ser, L-Thr ou L-Tyr dans lequel le groupe OH latéral est protégé par un groupe éther ou ester.

A<sub>2</sub> est le rest d'un α- aminoacide basique. Il provient d'un monoaminoacide ayant un pH supérieur à 7, c'est-à-dire comportant une fonction acide COOH et, en plus de la fonction basique en α, au moins une fonction basique latérale. Dans A<sub>2</sub> ladite fonction basique latérale n'est pas bloquée. Parmi les restes d'α-aminoacides qui conviennent, on peut mentionner notamment les restes Dab, L-Arg, L-Lys, L-His et L-Orn. Les restes préférés sont des restes d'α-L-aminoacides, notamment L-Arg, L-Lys, L-His et L-Orn, le reste le plus intéressant selon l'invention étant L-Arg.

Le groupe marqueur aminé R<sub>1</sub> est bien connu dans la technique des dosages biologiques et microbiologiques, voir à cet effet le document US-A- 4 448 715 précité. Il peut notamment être choisi parmi les groupes NH-R'<sub>1</sub> qui (i) induisent une modification de coloration, (ii) induisent une modification de fluorescence ou (iii) comportent au moins un élément radioactif. Convient au but de l'invention tout groupe amino NH-R'<sub>1</sub> donnant pendant ou après la réaction enzymatique un signal susceptible d'être amplifié pour être détecté (par exemple par mesure de la densité optique sous un longueur d'onde donnée, ou encore par mesure de la radioactivité).

Parmi les groupes fluorescents entrant dans la définition de R<sub>1</sub> on peut notamment citer les 4-méthylcoumaryl-7-amino, 4-trifluorométhylcoumaryl-7-amino et analogues.

Le groupe R<sub>1</sub> peut également représenter un groupe comportant un élément radioactif, par exemple un groupe anilino ou benzylamino marqué par un radioisotope <sup>14</sup>C ou <sup>3</sup>H.

Le groupe R<sub>1</sub> que l'on préfère suivant l'invention est un groupe chromogène, de façon typique un groupe nitrophényle (dans lequel le reste phényle est susceptible d'être substitué par un groupe COOH, F, Cl, Br, CH<sub>3</sub>, OCH<sub>3</sub>, CN, CF<sub>3</sub>, et/ou SO<sub>3</sub>H), un groupe naphthyle (dans lequel le reste naphthyle est susceptible d'être substitué par un groupe OCH<sub>3</sub>, COOH, SO<sub>3</sub>H ou CH<sub>3</sub>), un groupe pyrimidinyle, benzimidazole, triazinyle, indazolyle, prényle, coumaryle, quinolyle etc.

De façon avantageuse, le groupe R<sub>1</sub> représentera un reste aminé chromogène ou fluorescent. Parmi les groupes aminés chromogènes, qui conviennent suivant l'invention, on peut notamment citer les p-nitroanilino (en abrégé pNA), 2-carboxy-4-nitroanilino et 3-carboxy-4-nitroanilino, 2-halogéno-4-nitroanilino et 3-halogéno-4-nitroanilino (où l'halogène est F, Cl ou Br), 2-méthoxy-5-méthyl-4-nitroanilino, 2-hydroxysulfonyl-4-nitroanilino, 4-trifluorométhyl-2-nitroanilino, 4-trifluorométhyl-3-nitroanilino, 4-cyano-2-nitroanilino, 2-naphtylamino, 4-hydroxysulfonyl-1-naphtylamino, quinolylamino, nitroquinolylamino, 2-pyrimidinylamino et analogues.

Le groupe R<sub>1</sub> que l'on préfère suivant l'invention est un groupe chromogène, à savoir pNA, qui convient d'une manière générale à la détermination quantitative des enzymes protéolytiques susvisés et est particulièrement adapté à la détermination de la Protéine C et de la plasmine.

Les sels d'addition suivant l'invention sont essentiellement des sels d'addition d'acide obtenus par réaction d'un composé de formule I avec un acide minéral ou organique.

Le meilleur mode de mise en oeuvre de l'invention consiste à utiliser comme substrat un composé dipeptide, dans lequel R est CH<sub>3</sub>, R<sub>2</sub> et R<sub>3</sub> sont H, et, n vaut 1, et répondant à la formule :



où A<sub>1</sub> est choisi parmi les restes Ahx, L-Ala, β-Ala, L-ATC, L-Aze, L-But, L-CHA, L-CHG, L-CHT, Gly, L-4-Hyp, L-3-Hyp, L-Ile, L-Leu, L-NLeu, L-NVal, L-Phe, L-Pip, L-Pro, Sar, L-Ser, L-Thr, L-Tyr et L-Val et les restes L-CHT, L-4-Hyp, L-3-Hyp, L-Ser, L-Thr et L-Tyr dans lesquels le groupe OH latéral est protégé sous forme éther ou ester.

Les composés de formule II ont l'avantage de présenter une grande affinité pour l'eau à la différence des dérivés peptidiques antérieurement connus qui sont peu solubles ou peu dispersables dans l'eau. En raison de la faible affinité pour l'eau des peptides antérieurement connus, il est quelquefois nécessaire de leur adjoindre un solvant organique afin de pouvoir les utiliser. Les systèmes comprenant des solvants mixtes (notamment du type eau-solvant organique) ne sont guère compatibles d'une manière générale avec les milieux biologiques : ils entraînent soit une diminution de l'activité du substrat, soit encore dans certains cas une détérioration de l'enzyme que l'on veut doser. De plus, la faible affinité pour l'eau de ces substrats entraîne une diminution de la sensibilité des méthodes de dosage des enzymes. L'utilisation des composés de formule II permet de pallier avantageusement les inconvénients sus-énoncés.

De façon non limitative on a consigné dans le tableau I ci-après un certain nombre de composés dipeptides



**0 280 610**

suivant l'invention notés "Ex" avec des peptides de référence notés "A1-A4", et, des peptides de comparaison notés "B1-B4" comportant le groupe protecteur terminal  $\text{CH}_3\text{O}-\text{CO}-\text{CH}_2-\text{CO}$  selon l'invention et "C1-C4" sans ledit groupe protecteur.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

0 280 610

TABLEAU I

Q-A<sub>1</sub>-A<sub>2</sub>-pNA, xHX

PRODUIT	N° DE CODE	Q	A <sub>1</sub>	A <sub>2</sub>	xHX
EX 1	SQ 41	MM	L-Pro	L-Arg	H-TFA
EX 2	SQ 57	MM	L-Val	L-Arg	H-TFA
EX 3	SQ 58	MM	L-Ala	L-Arg	H-TFA
EX 4	SQ 59	MM	L-Phe	L-Arg	H-TFA
EX 5	SQ 60	MM	L-Ser (Bzl)	L-Arg	H-TFA
EX 6	SQ 61	MM	β-Ala	L-Arg	H-TFA
EX 7	SQ 62	MM	L-Leu	L-Arg	H-TFA
EX 8	SQ 63	MM	L-NLeu	L-Arg	H-TFA
EX 9	SQ 64	MM	L-NVal	L-Arg	H-TFA
EX 10	SQ 65	MM	L-4-Hyp	L-Arg	H-TFA
EX 11	SQ 66	MM	Gly	L-Arg	H-TFA
EX 12	SQ 67	MM	L-ATC	L-Arg	H-TFA
EX 13	SQ 68	MM	Aib	L-Arg	H-TFA
EX 14	SQ 69	MM	L-But	L-Arg	H-TFA
EX 15	SQ 70	MM	L-Thr (Bzl)	L-Arg	H-TFA
EX 16	SQ 73	MM	L-Ahx	L-Arg	H-TFA
EX 17	-	MM	L-CHA	L-Lys	H-TFA
EX 18	-	MM	L-Lys(ε-Cbo)	L-Arg	AcOH

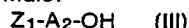
TABLEAU I (fin)

PRODUIT	N° DE CODE	Q	A <sub>1</sub>	A <sub>2</sub>	xHX
EX 19	-	(1)	L-Val	L-Arg	AcOH
EX 20	-	(2)	L-Leu	L-Orn	AcOH
EX 21	-	(2)	L-CHG	L-Arg	AcOH
EX 22	-	(1)	L-CHA	L-Arg	AcOH
EX 23	-	MM	Ahx	L-Lys	AcOH
EX 24	-	MM	L-Pro	L-His	AcOH
A <sub>1</sub>	34.47	H	D-CHG-L-But	L-Arg	2AcOH
A <sub>2</sub>	31.39	CH <sub>3</sub> SO <sub>2</sub>	D-Leu-Gly	L-Arg	AcOH
A <sub>3</sub>	30.41	H	D-But-L-CHA	L-Arg	2AcOH
A <sub>4</sub>	65.25	H	D-Lys(εCbo)- L-Pro	L-Arg	2AcOH
B <sub>1</sub>	SQ 72	MM	Gly-L-Pro	L-Arg	H-TFA
C <sub>1</sub>	-	H	Gly-L-Pro	L-Arg	2 H-TFA
B <sub>2</sub>	SQ 71	MM	Gly-L-Pip	L-Arg	H-TFA
C <sub>2</sub>	-	H	Gly-L-Pip	L-Arg	2 H-TFA
B <sub>3</sub>	SQ 56	MM	D-Pro-L-Pro	L-Arg	H-TFA
C <sub>3</sub>	55.10	H	D-Pro-L-Pro	L-Arg	2 H-TFA
B <sub>4</sub>	SQ 52	MM	D-NLeu-L-CHA	L-Arg	H-TFA
C <sub>4</sub>	33 08	H	D-NLeu-L-CHA	L-Arg	2 H-TFA
<b>Notes</b>					
(1) pCH <sub>3</sub> C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> SO <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> O-CO-CH <sub>2</sub> -CO					
(2) pMeOC <sub>6</sub> H <sub>4</sub> O-CO-CH <sub>2</sub> CO;					

Les composés dipeptides de formules I et II ci-dessus peuvent être préparés selon une méthode connue en soi par application de mécanismes réactionnels classiques. Suivant l'invention on préconise un procédé de

préparation qui est caractérisé en ce qu'il comprend :

1°) la réaction d'un  $\alpha$ -aminoacide N-protégé par un groupe protecteur temporaire approprié  $Z_1$  de formule :



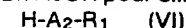
où  $A_2$  est défini comme ci-dessus, avec un isocyanate, correspondant au groupe marquer  $R_1$ , de formule :



pour obtenir un composé de formule :



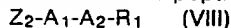
2°) la soumission du composé V ainsi obtenu à une réaction d'acidolyse au moyen d'un mélange  $HBr/AcOH$  pour éliminer le groupe protecteur  $Z_1$  et obtenir le dérivé de formule :



3°) la réaction du dérivé VI ainsi obtenu avec un aminoacide N-protégé de formule :



où  $A_1$  est défini comme indiqué ci-dessus et  $Z_2$  est un groupe protecteur temporaire, pour obtenir par condensation un dipeptide protégé de formule :

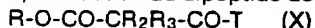


4°) la soumission dudit dipeptide N-protégé de formule VIII ainsi obtenu à une réaction d'acidolyse au moyen de l'acide trifluoroacétique pour éliminer le groupe protecteur  $Z_2$  et donner un dipeptide de formule :



et,

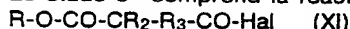
5°) la réaction du dipeptide de formule IX ainsi obtenu avec un composé de formule :



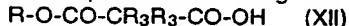
où  $R_1$ ,  $R_2$  et  $R_3$  sont définis comme indiqué ci-dessus et T représente OH, F, Cl ou Br (l'atome d'halogène préféré étant le chlore) pour obtenir le composé de formule I attendu.

Le groupe protecteur temporaire  $Z_1$  qui intervient au stade 1° est ici un groupe protecteur classique bien connu de l'homme de l'art, par exemple Boc, Aoc, Adoc, Foc, Iboc, Z, Z(p-Cl), Z(p-OMe) ou analogue. Le groupe protecteur temporaire  $Z_2$  est un groupe protecteur classique de l'extrémité N-terminale, ici ce groupe est identique ou analogue à  $Z_1$ .

Le stade 5° comprend la réaction du dipeptide de formule IX avec un halogénure d'acide :



où Hal représente un halogène F, Cl, ou Br, ou avec un acide :



De façon avantageuse la réaction  $IX + XI \rightarrow I$  est mise en oeuvre dans un solvant inerte tel que notamment le DMF en présence d'une base en excès agissant comme co-solvant et accepteur de protons, notamment  $Et_3N$ , avec un rapport molaire IX/XI inférieur ou égal à 1/2.

De façon avantageuse la réaction  $IX + XII$  est effectuée dans un solvant inerte tel que notamment le DMF en présence d'une base en excès intervenant comme co-solvant et accepteur de protons, notamment  $Et_3N$ , de HOBT et de DCCI, à une température voisine de 0°C pendant au moins 1 heure puis à RT pendant au moins 24 heures, le rapport molaire IX/XII étant compris entre 1/1 et 1/1,5.

De façon préférée, on utilisera dans la réaction  $IX + XI \rightarrow I$  un rapport molaire IX/ $Et_3N$  inférieur ou égal à 1/2,7 et dans la réaction  $IX + XII \rightarrow I$  un rapport molaire IX/ $Et_3N$  de l'ordre 1/1,1, un rapport molaire IX/HOBT de l'ordre de 1/2 et un rapport molaire IX/DCCI de l'ordre de 1/1,18 à 1/1,20. Dans cette dernière réaction le couplage se fait par une activation in situ de la fonction acide en présence de DCCI et HOBY, HOBT étant un agent de couplage non racémisant.

D'autres avantages et caractéristiques de l'invention seront mieux compris à la lecture qui va suivre d'exemples de préparation et d'essais comparatifs, l'ensemble de ces éléments n'étant pas limitatif mais donné à titre d'illustration.

## PREPARATION I

### Obtention de MM-L-4-Hyp-L-Arg-pNA, H-TFA

(Exemple 10 : No de code : SQ 65)

#### a) Z-L-Arg-pNA, HCl

On dissout 13 g (41 mmoles) de Z-L-Arg-OH, HCl (préalablement séché sur  $P_2O_5$ ) dans 100 ml de HMPT anhydre à RT. On additionne à RT 5,7 ml de  $Et_3N$  et ensuite graduellement 82 mmoles d'isocyanate de p-nitrophényle (2 eq). On laisse le mélange réactionnel sous agitation à RT pendant 24 h. On concentre ensuite le milieu réactionnel par distillation de HMPT sous pression réduite. Le résidu d'évaporation est repris plusieurs fois avec une solution aqueuse de AcOH à 30 % p/v. La solution acétique est purifiée par HPLC préparative sur un système "PROTEIN-PAK" (colonne échangeuse d'ions "SP 5PW" de dimensions : 15cm x 2,15cm; commercialisée par la société dite MILLIPORE WATERS). On obtient le produit attendu à l'état pur avec un rendement de 45% :



Ce produit ainsi obtenu est homogène en CCM :

Rf. = 0,6 avec comme éluant :  $\text{CHCl}_3$ -MeOH-AcOH (5/3/1) v/v; et

Rf. = 0,5 avec comme éluant :  $\text{CHCl}_3$ -MeOH-AcOH- $\text{H}_2\text{O}$  (60/45/24/6) v/v.

Les fractions obtenues après chromatographie préparative sont contrôlées en HPLC sur une colonne de même nature (de dimension : 7,5 cm x 0,75 cm), la phase mobile utilisée étant un gradient de 2 tampons allant en 25 minutes de 100 % de tampon A

(Tris 20 mM à pH 8,5 et acétonitrile 10 %) à 100 % de tampon B (Tris 20 mM à pH 8,5 + NaCl 1 M et acétonitrile 10 %) à un débit de 1 ml/min, la détection étant réalisée à 254 nm et à 20°C.

#### b) H-Arg-pNA, 2HBr

A 10 g (23 mmoles) de Z-Arg-pNA, HCl ainsi obtenu on ajoute successivement 20 ml d'anisole, 80 ml de AcOH glacial et 100 ml d'une solution de HBr à 45 % dans AcOH glacial. On laisse le milieu réactionnel à RT pendant une heure et suit l'évolution de la réaction par CCM. Dès qu'elle est achevée, on transvase le milieu réactionnel dans un litre d'éther et agite vigoureusement pendant quelques minutes. Après décantation, le surnageant est aspiré au moyen d'un tube plongeant muni d'un filtre en verre fritté. L'opération de lavage dans l'éther est répétée plusieurs fois (au moins trois fois) et le produit obtenu est séché. On obtient 9,5 g (rendement : 97 %) de H-Arg-pNA, 2HBr sous forme de poudre  $[\alpha]_{20}^{20^\circ\text{C}}_{546\text{ nm}} = +55,1^\circ$  (c = 1% dans MeOH).

Ce produit est homogène en CCM [ éluant :  $\text{CHCl}_3$ /MeOH/AcOH (5/3/1) v/v]; Rf. = 0,4.

L'analyse par HPLC sur "PROTEIN- PAK" "SP 5PW" (dimensions : 7,5 cm x 0,75 cm) avec le gradient sus-décrit de tampons A et B donne un temps de rétention de 34,6 minutes.

#### c) Boc-L-4-Hyp-L-Arg-pNA, HBr

On introduit sous agitation 10 g (1 eq) de H-L-Arg-pNA, 2HBr et 5,0575 g (1 eq) de Boc-L-4-Hyp-OH dans un ballon contenant 66 ml de DMF et refroidi au moyen d'un bain de glace. Lorsque la température d'équilibre est atteinte, on ajoute 3,055 ml (1 eq) de  $\text{Et}_3\text{N}$  6,785 g (1,5 eq) de DCCl et 6,695 g (2eq) de HOBT. On laisse réagir le milieu réactionnel pendant 24 heures. On contrôle l'achèvement de la réaction par CCM puis ajoute la réaction terminée 10 ml de AcOH glacial et agite pendant 0,25 h. Par filtration de la DCHU formée et évaporation du filtrat sous pression réduite, on obtient par précipitation dans l'éther 6,823 g du produit attendu homogène par CCM et HPLC.

#### Analyse

1°) CCM sur couche de silice

- CCM (A) avec éluant : mélange  $\text{CHCl}_3$ /MeOH/AcOH (50/30/10) v/v

Rf = 0,75

- CCM (B) avec éluant : mélange n-butanol/AcOH/eau (3/1/1) v/v

Rf = 0,60

2°) HPLC sur "PROTEIN PAK" (avec gradient de deux tampons comme indiqué ci-dessus : les tampons A et B précités), temps de rétention 16,6 minutes.

3°) Pouvoir rotatoire

$[\alpha]_{20}^{20^\circ\text{C}}_{546\text{ nm}} = -45,50^\circ$  (c = 1% dans MeOH)

#### d) H-L-4-Hyp-L-Arg-pNA, 2H-TFA

Dans un ballon muni d'une garde de  $\text{CaCl}_2$ , on introduit 6,823 g (1 eq) de Boc-L-4-Hyp-L-Arg-pNA, HBr, 32,6 ml (3,7 eq) de H-TFA et 32,6 ml de dichlorométhane. La durée de réaction est d'environ 1 h; 30 min après le début de la réaction, on contrôle son évolution par CCM (A) et CCM (B) comme indiqué ci-dessus au stade c). Lorsque la réaction est achevée, on évapore H-TFA sous pression réduite, puis par précipitation dans l'éther, on obtient 7,382 g du produit attendu.

#### Analyse

1°) CCM sur silice

CCM (A) : Rf = 0,55

CCM (B) : Rf = 0,42

2°) HPLC (avec gradient de deux tampons : tampon A comme au stade b) et tampon C (Tris 20mM à pH 8,5 + acétonitrile 10 % + NaCl 1M)), temps de rétention : 18,4 minutes.

3°)  $[\alpha]_{20}^{20^\circ\text{C}}_{546\text{ nm}} = -21,4^\circ$  (c = 1% dans MeOH).

#### e) MM-L-4-Hyp-L-Arg-pNA, H-TFA

On introduit sous agitation 7,382 g (12 mmoles) de H-L-4-Hyp-L-Arg-pNA, 2H-TFA avec 35 ml de DMF dans un ballon de 50 ml refroidi au bain de glace et maintient l'agitation. Lorsque la température d'équilibre est atteinte, on ajoute 4,4 ml (31,4 mmoles; soit 2,7 eq) de  $\text{Et}_3\text{N}$  puis 2,5 ml (24 mmoles) de chlorure de méthoxyoxymalonyl (MMCl). Après 6 h on contrôle l'achèvement de la réaction par CCM. Si la réaction n'est pas terminée on ajoute 1,5 eq (2,5 ml) de  $\text{Et}_3\text{N}$  puis 5 minutes après 1 eq (1,25 ml) de MMCl. Au bout de 24 h on contrôle l'achèvement de la réaction par CCM. La réaction étant achevée on évapore à sec sous pression réduite et par précipitation dans l'éther on obtient 7,219 g du produit attendu. Ce produit brut est purifié par HPLC préparative et contrôlé par HPLC analytique. Seules sont réunies les fractions homogènes répondant

favorablement à une hydrolyse enzymatique et conduisant à une libération de pNa. Les fractions ainsi retenues que l'on obtient sont concentrées sous pression réduite puis lyophilisées.

#### Analyse

- 5 1°) CCM sur silice  
CCM (A) : Rf = 0,85  
CCM (B) : Rf = 0,52  
2°) HPLC (avec un gradient de deux tampons: tampons A et B du stade b)), temps de rétention : 16 minutes.  
10 3°)  $[\alpha]_{20^\circ\text{C}}^{546\text{ nm}} = -30,4^\circ$  (c = 1 % dans MeOH)

#### PREPARATION II

En procédant suivant le procédé de la préparation I, mais en remplaçant l'isocyanate de p-nitrophényle par l'isocyanate de  $\sigma$ -chloro-p-nitrophényle, on obtient le MM-L-4-Hyp-L-Arg- $\sigma$ -Cl-pNA, H-TFA.

#### PREPARATION III

Obtention de MM-L-Pro-L-Arg-pNA, H-TFA (Exemple 1; n° de code : SQ 41)

- 15 Dans un ballon on dissout successivement 317 mg (2,68 mmoles) d'acide monométhoxyoxymalonique, 1,66 g (2,68 mmoles) de H-L-Pro-L-Arg-pNA, 2H-TFA, 800 mg (5,36 mmoles) de HOBT et 413  $\mu\text{l}$  (2,95 mmoles) et Et<sub>3</sub>N dans 15 ml de DMF. Le mélange est refroidi dans de la glace et mis sous agitation. On ajoute 660 mg (3,2 mmoles) de DCCI et maintient l'agitation pendant une heure à 0° C et 24 heures à RT. On suit l'évolution de la réaction par CCM. Après achèvement de la réaction on filtre pour écarter la DCHU formée et évapore le solvant du filtrat sous pression réduite. Le résidu d'évaporation ainsi obtenu est précipité dans l'éther et purifié par HPLC préparative sur dispositif "PROTEIN PAK" SP 5 PW ( de dimensions 15 cm x 2,15 cm). Les fractions  
20  
25 recueillies sont homogènes en CCM et HPLC.

#### Analyse

- 30 1°) CCM sur silice  
CCM (A) : Rf = 0,64  
CCM (B) : Rf = 0,60  
2°) HPLC (gradient de deux tampons : tampons A et B de la préparation Ia)), temps de rétention : 16,4 minutes  
3°)  $[\alpha]_{20^\circ\text{C}}^{546\text{ nm}} = -65,9^\circ$  (c = 1% dans MeOH)  
35 On a consigné ci-après dans le tableau II les caractéristiques des produits suivant l'invention.

TABLEAU II

PRODUIT	[ $\alpha$ ] <sub>20°C</sub> <sub>546 nm</sub> (conc. / MeOH)	Rf		HPLC	
		CCM(A)	CCM(B)	(a)	(b)
EX 1	-65,9° (1%)	0,64	0,60	16,4	A-B
EX 2	-33° (1%)	0,98	0,64	14	A-C
EX 3	-25° (1%)	0,96	0,56	13	A-C
EX 4	-9,6° (1%)	0,94	0,69	34,4	A-B
EX 5	-16,9° (1%)	0,97	0,75	37,5	A-B
EX 6	-18,7° (1%)	0,79	0,58	26,2	A-B
EX 7	-22° (1%)	1,0	0,66	22	A-B
EX 8	-46,7° (1%)	0,99	0,64	26,6	A-B
EX 9	+21,3° (1%)	0,975	0,63	19,8	A-B
EX 10	-30,4° (1%)	0,85	0,52	16	A-B
EX 11	-13,5° (1%)	0,8	0,5	19,9	A-B
EX 12	-40,4° (1%)	0,92	0,53	23,7	A-B
EX 13	+1,08° (1%)	0,9	0,56	23,6	A-B
EX 14	-15,8° (1%)	0,925	0,59	17,1	A-B
EX 15	-13,0° (1%)	0,90	0,77	33,8	A-B

## Notes:

(a) temps de rétention en minutes

(b) gradient de deux tampons allant en 25 minutes de 100% de A à 100 % de B ou C, puis restant pendant 20 minutes à 100% de B ou C; lecture à 254 nm, à 20° C (pour tampons A et B, voir préparation Ia et pour tampon C voir préparation Id)

**ACTIVITE DES SUBSTRATS**

L'activité des dipeptides suivant l'invention et des tripeptides consignés dans le tableau I a été étudiée sur la thrombine humaine, la plasmine humaine, le Facteur Xa humaine et la Protéine C bovine, les tripeptides A1-A4 étant les substrats de référence du commerce. La libération du marqueur HR<sub>1</sub> (i.e. amine H<sub>2</sub>HR'<sub>1</sub>), qui est

objectivée par la variation de OD pendant l'hydrolyse enzymatique des substrats, sert d'outil de comparaison. La lecture de OD est en général effectuée à 300-470 nm, et plus précisément à 405 nm quand R<sub>1</sub> est pNA, pendant environ 5 minutes.

Les essais ont été réalisés sur appareil GILFORD 203 S pour automatiser la lecture des échantillons et standardiser leur traitement.

**Enzymes**

On prépare des solutions dans du sérum physiologique renfermant chacune un enzyme :

thrombine humaine 3 UNIH/ml

Facteur Xa humain 3,7 nkat/ml

plasmine humaine 2,3 nkat/ml

protéine C bovine activée 10 µg/ml

**Substrats**

On dissout chaque peptide à tester dans le l'eau à une concentration de 10 mg/ml.

**Mesures**

400 µl d'enzyme dilué au 1/2 dans du tampon TEA (pH 8,4) sont ajoutés à 200 µl de chacun des différents peptides à tester. On détermine les vitesses d'hydrolyse desdits substrats en suivant l'évolution de la libération de pNA. Cette évolution peut être suivie par la lecture de la variation de OD par unité de temps ( $\Delta OD/\text{minute}$ ) à 405 nm.

**Résultats**

Les résultats obtenus (exprimés en  $\Delta OD/\text{minute}$ ) sont consignés dans le tableau III ci-après. Ils mettent en évidence que :

(i) les produits EX 1 et EX 10 sont particulièrement intéressants en tant que substrats, EX 1 et EX 10 étant plus sensibles à la protéine C que le produit de référence A4, le produit EX 10 étant en outre plus sensible à la plasmine que le produit de référence A3;

(ii) le produit EX 12 est particulièrement spécifique vis-à-vis de la protéine C;

(iii) le produit EX 4 est particulièrement spécifique vis-à-vis de la plasmine;

(iv) le produit EX 11 est plus sensible vis-à-vis du facteur Xa que vis-à-vis de la thrombine, de la plasmine et de la protéine C; et

(v) dans la série des tripeptides, par comparaison de B1 avec C1, de B2 avec C2, de B3 avec C3, de B4 avec C4, on constate que le remplacement du groupe H de l'atome d'azote terminal du peptide par le groupe MM selon l'invention, diminue systématiquement l'activité.



TABLEAU III

PRODUIT	N°code	Vitesse d'hydrolyse en $\Delta OD$ /minute			
		Thrombine	Facteur Xa	Plasmine	Protéine C
EX 1	SQ 41	0,68	0,14	0,230	0,83
EX 2	SQ 57	0,21	0,03	0,08	0,12
EX 3	SQ 58	0,20	0,05	0,03	0,04
EX 4	SQ 59	0,05	0,13	0,64	0,16
EX 5	SQ 60	0,07	0,09	0,20	0,08
EX 6	SQ 61	0,02	0,03	0,05	0,02
EX 7	SQ 62	0,04	0,16	0,17	0,10
EX 8	SQ 63	0,04	0,16	0,21	0,11
EX 9	SQ 64	0,14	0,07	0,17	0,12
EX 10	SQ 65	0,61	0,34	1,12	0,88
EX 11	SQ 66	0,03	0,15	0,04	0,04
EX 12	SQ 67	0,18	0,07	0,14	0,41
EX 13	SQ 68	0,04	0,01	0,02	0,03
EX 14	SQ 69	0,19	0,06	0,10	0,25
EX 15	SQ 70	0,05	0,01	0,04	0,08
EX 16	SQ 73	0,24	0,03	0,07	0,08
A1	34.47	0,782	-	-	-
A2	31.39	-	1,312	-	-
A3	30.41	-	-	0,235	-
A4	65,25	-	-	-	0,520

TABLEAU III (fin)

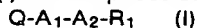
5	B1	SQ 72	0, 13	0, 02	0, 03	0, 18
	C1	-	0, 516	0, 01	0, 04	0, 24
10	B2	SQ 71	0, 14	0, 01	0, 04	0, 09
	C2	-	0, 35	0, 04	0, 02	0, 17
15	B3	SQ 56	0, 05	0, 01	0, 01	0, 03
	C3	55. 10	0, 32	0, 59	0, 02	1, 08
20	B4	SQ 52	0, 01	0, 01	0, 04	0, 02
	C4	33. 08	0, 61	0, 02	0, 65	0, 11

25 Les dérivés dipeptides de formule I selon l'invention sont particulièrement intéressants en tant que substrats enzymatiques dans le domaine des dosages. Ils peuvent être conditionnés sous forme de kits ou trousse de dosage avec les autres réactifs requis pour lesdits dosages.

### Revendications

35 1. Composé dipeptidique caractérisé en ce qu'il est choisi parmi l'ensemble comprenant :

(i) les composés de formule :



dans laquelle :

Q est un reste  $RO-CO-(CR_2R_3)_n-CO$  où

40 R représente l'atome d'hydrogène, un groupe alkyle en  $C_1-C_4$ , un groupe phényle éventuellement substitué par un ou plusieurs groupes notamment  $CH_3$ ,  $OCH_3$  et alkylènedioxy, un groupe benzyle éventuellement substitué par un ou plusieurs groupes, notamment  $CH_3$ ,  $OCH_3$  et alkylènedioxy, ou, un groupe tosylméthyloxy;

45  $R_2$  et  $R_3$ , identiques ou différents, représentent chacun l'atome d'hydrogène ou un groupe alkyle en  $C_1-C_4$ ;

n est un nombre entier ayant pour valeur 1 à 5;  $R_1$  qui est un reste amino de formule  $NH-R'_1$  constitue un marqueur clivable du groupe  $A_2$  par hydrolyse enzymatique, le groupe  $R'_1$  intervenant comme support du moyen de marquage;

50  $A_1$  est un reste de monoaminoacide choisi parmi l'ensemble comprenant les restes d'acides aminés non-basiques;

$A_2$  est un reste de monoaminoacide choisi parmi l'ensemble comprenant les restes d' $\alpha$ -aminoacides basiques; et

(ii) leurs sels d'addition.

55 2. Composé dipeptidique suivant la revendication 1, caractérisé en ce que  $A_1$  est un reste choisi parmi l'ensemble comprenant

1°) les restes d'acides aminés naturels ou synthétiques qui comprennent une seule fonction acide et une seule fonction basique,

60 2°) les restes d'acides aminés naturels ou synthétiques qui comprennent une seule fonction basique et plus d'une fonction acide et dans lesquels chaque fonction acide latérale est susceptible d'être bloquée notamment sous forme amidé ou ester, et

3°) les restes d'acides aminés naturels ou synthétiques qui comprennent une seule fonction acide et plus d'une fonction basique et dans lesquels chaque fonction basique latérale est convenablement substituée pour supprimer essentiellement le caractère basique,

65 lesdits restes sus-visés pouvant comporter des groupes hydroxyle (OH) ou thiol (SH) latéraux qui sont susceptibles d'être bloqués, le cas échéant, par un groupe protecteur éther ou ester.

2. Composé dipeptidique suivant la revendication 1, caractérisé en ce que  $A_1$  est choisi parmi l'ensemble constitué par

a) Ala,  $\beta$ -Ala, Cys, Gln, Gly, 4-Hyp, 3-Hyp, Leu, Met, NLeu, NVal, Phe, Pro, Sar, Ser, Thr, Tyr et Val, où le groupe OH latéral des restes 4-Hyp, 3-Hyp, Ser, Thr et Tyr est protégé ou non par un groupe protecteur éther ou ester, et où le groupe SH latéral du reste Cys est protégé ou non par un groupe protecteur thioéther ou thioester,

b) Asp,  $\beta$ -Asp, Glu et  $\gamma$ -Glu, dans lesquels la fonction acide latérale est libre ou bloquée sous forme ester, notamment sous forme d'ester benzylque ou t-butylque;

c) Arg, Dab, Lys, His et Orn convenablement bloqué pour éliminer substantiellement le caractère basique,

d) ACC, Ahx, Aib, ATC, Aze, But, 4-But, CHA, CHG, CHT (où le groupe OH latéral est protégé le cas échéant sous forme éther ou ester), Cle,  $\pi$ -Dab, Phg, Pip et Pyr;

4. Composé dipeptidique suivant la revendication 1, caractérisé en ce que le groupe  $A_1$  est choisi parmi l'ensemble comprenant les restes Aib, L-Ala,  $\beta$ -Ala, L-ATC, L-Aze, L-But, 4-But, L-CHA, L-CHG, L-CHT, Cle, Gly, L-4-Hyp, L-3-Hyp, L-Ile, L-Leu, L-NLeu, L-NVal, L-Phe, L-Pip, L-Pro, Sar, L-Ser, L-Thr, L-Tyr et L-Val, les restes L-CHT, L-4-Hyp, L-3-Hyp, L-Ser, L-Thr et L-Tyr dans lesquels le groupe OH latéral est protégé par un groupe éther ou ester, et, les restes L-Arg, L-Lys, L-His et L-Orn dans lesquels la fonction basique latérale est convenablement bloquée pour éliminer substantiellement le caractère basique.

5. Composé dipeptidique suivant la revendication 1, caractérisé en ce que  $A_2$  est choisi parmi l'ensemble comprenant les L-Arg, L-Lys, L-His et L-Orn.

6. Composé dipeptidique suivant la revendication 1, caractérisé en ce que R est  $CH_3$ ,  $R_2$  est H,  $R_3$  est H, et, n est 1.

7. Composé dipeptidique suivant la revendication 1, caractérisé en ce que le groupe  $R_1$  est choisi parmi les groupes aminés  $NH-R'_1$  qui (i) induisent une modification de coloration (ii) induisent une modification de fluorescence ou (iii) comportent au moins un élément radioactif.

8. Composé dipeptidique suivant la revendication 7, caractérisé en ce que  $R_1$  est pNA.

9. Composé dipeptidique suivant la revendication 1, caractérisé en ce qu'il est choisi parmi l'ensemble comprenant les  $CH_3O-CO-CH_2-CO-L-Pro-L-Arg-pNA$ ,  $CH_3O-CO-CH_2-CO-L-4-Hyp-L-Arg-pNA$  et leurs sels d'addition.

10. Procédé de préparation d'un composé dipeptidique de formule I suivant la revendication 1, caractérisé en ce qu'il comprend :

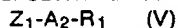
1°) la réaction d'un  $\alpha$ -aminoacide N-protégé par un groupe protecteur temporaire approprié  $Z_1$ , de formule :



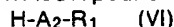
où  $A_2$  est défini comme ci-dessus, avec un isocyanate, correspondant au groupe marqueur  $R_1$ , de formule :



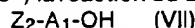
pour obtenir un composé de formule :



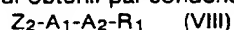
2°) la soumission du composé V ainsi obtenu à une réaction d'acidolyse au moyen d'un mélange HBr/AcOH pour éliminer le groupe protecteur  $Z_1$  et obtenir le dérivé de formule :



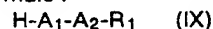
3°) la réaction du dérivé VI ainsi obtenu avec un aminoacide N-protégé de formule :



où  $A_1$  est défini comme indiqué ci-dessus et  $Z_2$  est un groupe protecteur temporaire analogue à  $Z_1$ , pour obtenir par condensation un dipeptide protégé de formule :

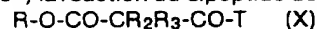


4°) la soumission dudit dipeptide N-protégé de formule VIII ainsi obtenu à une réaction d'acidolyse au moyen de l'acide trifluoroacétique pour éliminer le groupe protecteur  $Z_2$  et donner un dipeptide de formule :



et,

5°) la réaction du dipeptide de formule IX ainsi obtenu avec un composé de formule :



où  $R_1$ ,  $R_2$  et  $R_3$  sont définis comme indiqué ci-dessus et T représente OH, F.Cl ou Br.



Office européen  
des brevets

# RAPPORT DE RECHERCHE EUROPEENNE

Numero de la demande

EP 88 40 0304

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS			
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	Revendication concernée	CLASSEMENT DE LA DEMANDE (Int. CL 4)
X	GB-A-2 130 221 (SQUIBB) * En entier * ---	1-4, 6, 9, 10	C 07 K 5/06 C 12 Q 1/36
D, Y	FR-A-2 471 411 (ABBOTT) * En entier * ---	1, 2, 7, 8, 10	
Y	CH-A- 616 912 (SANDOZ) * En entier * ---	1, 2, 10	
A	EP-A-0 085 255 (FUJISAWA) * En entier * ---	1	
A	EP-A-0 074 787 (SMITHKLINE BECK.) * En entier * ---	1	
Y	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 92, 1980, page 742, résumé no. 129294c, Columbus, Ohio, US; M. BIENERT et al.: "Synthesis of substance P and of acylated partial sequences", & J. PRAKT. CHEM. 1979, 321(5), 721-40 * Résumé * ---	1, 2, 10	
A	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 83, 1975, pages 77-78, résumé no. 108713n, Columbus, Ohio, US; H. NIEDRICH et al.: "Action mechanism of peptides attacking smooth muscles. III. Effect of N-acylation upon the effectiveness of C-terminal partial sequences of eledoisin, physalemin, and the substance P at the guinea pig ileum", & ACTA BIOL. MED. GER. 1975, 34(3), 483-9 * Résumé * --- -/-	1	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int. CL 4) C 07 K 5/00 C 12 Q 1/00
Le présent rapport a été établi pour toutes les revendications			
Lieu de la recherche LA HAYE		Date d'octroi de la recherche 25-05-1988	Examinateur RAJIC M.
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES			
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire		T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet antérieur, mais publié à la date de dépôt ou après cette date D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant	

EPO FORM 1503 (03.82) (P0402)



Office européen  
des brevets

## RAPPORT DE RECHERCHE EUROPEENNE

Page 2

Numero de la demande

EP 88 40 0304

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS			
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	Revendication concernée	CLASSEMENT DE LA DEMANDE (Int. Cl.4)
A	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 82, 1975, pages 667-668, résumé no. 140521p, Columbus, Ohio, US; & DD-A-107 947 (M. BIENERT et al.) 20-08-1974 * Résumé *	1	
A	EP-A-0 000 330 (CIBA-GEIGY) * Page de garde; pages 31-32, 35-36, 45 *	1	
			DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int. Cl.4)
Le présent rapport a été établi pour toutes les revendications			
Lieu de la recherche LA HAYE		Date d'achèvement de la recherche 25-05-1988	Examineur RAJIC M.
<b>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</b>			
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire		T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet antérieur, mais publié à la date de dépôt ou après cette date D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant	

EPO FORM 1501 01.82 (P0402)



...

